

Received: 2013.10.21
Accepted: 2014.01.30
Published: 2014.07.04

Reakcja nadwrażliwości kontaktowej Tc1 zależna, jej mechanizm i regulacja*

Tc1-mediated contact sensitivity reaction, its mechanism and regulation

Magdalena Zemelka-Wiącek, Marian Szczepanik

Katedra Biologii Medycznej, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa UJ CM

Streszczenie

Reakcja nadwrażliwości kontaktowej (CHS) na hapteny jest klasycznym przykładem odpowiedzi komórkowej. W fazie efektorowej CHS można wyróżnić dwa kolejno występujące po sobie etapy: fazę wczesną występującą już dwie godziny od kontaktu z haptenu oraz fazę późną rozwijającą się po około 24 godzinach, a mediowaną przez limfocyty efektorowe TCRαβ⁺. W zależności od użytego haptenu oraz szczepu myszy komórkami efektorowymi są limfocyty pomocnicze CD4⁺ Th1 lub limfocyty cytotoksyczne CD8⁺ Tc1. W inicjacji CHS główną rolę odgrywają limfocyty NKT wspomagające komórki B1 w wytwarzaniu swoistych przeciwciał IgM. Wystąpienie fazy wczesnej jest niezbędne do rekrutacji komórek T efektorowych do miejsca depozycji haptenu i rozwinięcia się pełnej reakcji zapalnej. Reakcja CHS jest kontrolowana w fazie indukcyjnej i efektorowej przez komórki regulatorowe (Treg) CD4⁺.

Nowe spojrzenie na mechanizmy negatywnej regulacji reakcji CHS zależnej od komórek Tc1 CD8⁺ to supresja wywołana naskórnym (EC) podaniem antygeny białkowego. Aplikacja antygeny DNP-BSA na skórę, w opatrunku z gazy, prowadzi do wytworzenia stanu tolerancji. Powoduje to powstanie komórek Treg o fenotypie TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, które działają przez bezpośredni kontakt komórek Treg-Tef, a hamowanie odpowiedzi odbywa się z udziałem molekuly CTLA-4. Wspomniana metoda wywołania tolerancji może się przyczynić do opracowania nowej metody terapeutycznej reakcji alergicznego kontaktowego zapalenia skóry, cechującej się bezinwazyjnością, prostotą użycia oraz brakiem działań niepożądanych.

Słowa kluczowe:

reakcja nadwrażliwości kontaktowej • limfocyty Tc1 • komórki Treg • naskórna immunizacja

Summary

The contact hypersensitivity reaction (CHS) to haptens is a classic example of cell-mediated immune response. In the effector phase, two stages can be distinguished: an early component, that appears only 2 hours after subsequent contact with the hapten, and the late component that develops approximately 24 hours later which is mediated by TCRαβ⁺ cells. The effector lymphocytes may be CD4⁺ T helper 1 (Th1) cells or CD8⁺ T cytotoxic 1 (Tc1) cells, which depends on the employed hapten and/or mice strain. NKT lymphocytes play the crucial role in the CHS initiation, by supporting B1 cells in the antigen-specific IgM antibodies production. The development of an early component is essential for the recruitment of T effector (Teff) cells to the side of hapten deposition and for the complete expansion of inflammatory reaction. The CHS reaction is under T regulatory (Treg) cells control, both in the induction phase as well as in the effector phase.

* Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu ze środków MNiSW: N N401 545940 oraz ze środków NCN UMO-2011/01/B/NZ6/00300, UMO-2011/03/B/NZ6/00821, UMO-2011/03/B/NZ6/00801 oraz UMO-2012/05/B/NZ6/00997z

<p>Key words:</p>	<p>A new view of a negative regulation of the Tc1 mediated CHS response is based on the suppression induced by epicutaneous (EC) application of protein antigen. The DNP-BSA skin application, on a gauze patch, leads to a state of immunosuppression. This maneuver results in rising the population of Treg cells with TCR$\alpha\beta$+CD4+CD25+Foxp3+ phenotype. The mechanism of suppression requires direct contact between Treg cells and Teff cells and the participation of CTLA-4 molecule is also necessary. The described method of evoking immune tolerance via EC immunization may contribute to elaborate a new method of allergic contact dermatitis therapy. This is because of its effectiveness, ease of induction and non-invasive protein antigen application.</p> <p>contact hypersensitivity • Tc1 lymphocyte • Treg cells • epicutaneous immunization</p>
<p>Full-text PDF:</p> <p>Word count:</p> <p>Tables:</p> <p>Figures:</p> <p>References:</p>	<p>http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1111925</p> <p>4935</p> <p>–</p> <p>2</p> <p>139</p>

Adres autora: prof. dr hab. n. med. Marian Szczepanik, Katedra Biologii Medycznej, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa UJ CM, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków; e-mail: mmszczep@cyf-kr.edu.pl

Wykaz skrótów: **ACD** – alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (allergic contact dermatitis), **Ag** – antygen (antigen), **APC** – komórka prezentująca antygen (antigen presenting cell), **ATP** – adenosynotrifosforan (adenosine triphosphate), **B1** – limfocyt B typu 1 (B1 B lymphocyte), **C** – dopełniacz (complement), **CCL** – ligand chemokiny typu CC (CC chemokine ligand), **CCR** – receptory dla chemokin podklasy CC (receptor CC chemokine), **CD** – antygen różnicowania komórkowego (cluster of differentiation), **CD40L** – ligand receptora CD40 (CD40 ligand), **CHS** – reakcja nadwrażliwości kontaktowej (contact hypersensitivity), **CIA** – kolagenowe zapalenie stawów (collagen induced arthritis), **CLA** – antygen limfocytów zasiedlających skórę (cutaneous lymphocyte associated antigen), **COLL II** – kolagen typu II (collagen II), **CXCL** – ligand chemokiny typu CXC (CXC chemokine ligand), **CXCR** – receptory dla chemokin podklasy CXC (receptor CXC chemokine), **DC** – komórka dendrytyczna (dendritic cell), **DC-SIGN** – nieintegryna swoista dla komórek dendrytycznych chwytająca ICAM-3 (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin), **DDC** – skórne komórki dendrytyczne (dermal dendritic cells), **DNCB** – dinitrochlorobenzen (dinitrochlorobenzene), **DNFB** – 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (dinitrofluorobenzene), **DTH** – nadwrażliwość typu późnego (delayed-type hypersensitivity), **EAE** – eksperymentalne autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (experimental autoimmune encephalomyelitis), **EC** – naskórna (epicutaneous), **Fas** – białko należące do rodziny TNF (TNF receptor superfamily member), **FasL** – ligand receptora Fas (Fas ligand), **FcR** – receptor dla fragmentu Fc przeciwciała (Fc receptor), **Foxp3** – czynnik transkrypcyjny limfocytów T regulatorowych (forkhead box transcription factor), **GALT** – tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego (gut-associated lymphoid tissue), **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i monocytów (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), **HEV** – żyłka pozawłosowa z wysokim śródbłonkiem (high endothelial venule), **ICAM** – międzykomórkowa molekula adhezyjna (intercellular adhesion molecule), **ICOS** – kostymulator indukowany (inducible co-stimulator), **IFN** – interferon (interferon), **Ig** – immunoglobulina (immunoglobulin), **IL** – interleukina (interleukin), **IP** – białko indukowane przez interferon (interferon inducible protein), **LC** – komórki Langerhansa (Langerhans cells), **LFA** – antygen związany z czynnością limfocytów (lymphocyte function-associated antigen), **LT** – leukotrieny (leukotrienes), **mAb** – przeciwciała monoklonalne (monoclonal antibody), **MBP** – zasadowe białko mieliny (myelin basic protein), **MHC** – główny układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex), **MIP** – białko zapalne makrofagów (macrophage inflammatory protein), **mRNA** – matrycowy RNA (messenger RNA), **MS** – stwardnienie rozsiane (multiple sclerosis), **NKT** – limfocyt NKT (natural killer T lymphocyte), **OVA** – owoalbumina (ovalbumin), **OX** – oksazolone (oxazolone [4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one]), **PC** – komórka plazmatyczna (plasmocyte), **PCI** – chlorek pikrylu (picryl chloride); TNP-Cl lub TNCB, **PGD₂** – prostaglandyna D₂ (prostaglandin D₂), **Plt** – płytki krwi (platelets), **RANTES** – regulowany przez aktywację; ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T (regulated on activation normal T cells expressed and secreted), **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive

oxygen species), **TAP** – białko transportujące fragmenty antygeny (transporter associated with antigen processing), **TARC** – rodzina chemokin (thymus and activation-regulated chemokine), **Tc** – limfocyt cytotoksyczny (T cytotoxic cell), **TCR** – receptor limfocytu T (T cell receptor), **Tef** – limfocyt T efektorowy (T effector cell), **TGF** – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor), **Th** – limfocyt pomocniczy (T helper cell), **TLR** – receptory Toll-podobne (Toll like receptors), **TNCB** – trinitrochlorobenzen (trinitrochlorobenzene); PCI lub TNP-Cl, **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor), **TNFR2** – receptor 2 dla TNF (TNF-receptor 2), **TNP** – trinitrofenyl (trinitrophenyl), **TNP-Cl** – chlorek trinitrofenylu (trinitrophenyl chloride); PCI lub TNCB, **Tr1** – limfocyt regulacyjny typu 1 (type 1 regulatory T cell), **Treg** – limfocyt T regulatorowy (regulatory T cell), **Tyδ** – limfocyty Tyδ, **UV** – promieniowanie ultrafioletowe (ultraviolet radiation), **VCAM** – cząsteczka adhezyjna śródbłonna naczyniowego (vascular cell adhesion molecules), **VLA** – antygen bardzo późny (very late antigen).

REAKCJA NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

Nadwrażliwość kontaktowa (CHS – contact hypersensitivity) jest reakcją immunologiczną rozwijającą się po miejscowej ekspozycji (skóra, błony śluzowe) na substancje niskocząsteczkowe zwane haptenami i jest jedną z postaci nadwrażliwości typu późnego (DTH – delayed type hypersensitivity) [9]. Reakcja CHS przebiega w dwóch kolejno występujących po sobie etapach, fazy indukcyjnej i efektorowej. W fazie indukcyjnej hapteny łącząc się kowalencyjnie z białkami ustroju tworzą neoantygeny, które indukują powstanie uczulonych limfocytów. Powtórny kontakt z homologicznym związkiem uczulającym prowadzi do wystąpienia fazy efektorowej reakcji kontaktowej, objawiającej się zaczerwienieniem, obrzękiem z tworzeniem się pęcherzy, złuszczeniem się naskórka oraz świądem w miejscu depozycji haptenu [65].

Reakcja CHS jest procesem złożonym, w którym uczestniczą m.in. komórki prezentujące antygen (APC), komórki efektorowe: limfocyty Th1 CD4⁺ lub Tc1 CD8⁺, mastocyty, limfocyty B-1, komórki NKT oraz leukocyty krwi obwodowej (monocyty i neutrofile) [64,81]. Niedawne badania wskazują, że izolowane z wątroby komórki NK mogą również wywoływać reakcję CHS [84].

Kontaktowe zapalenie skóry

Klasycznym przykładem reakcji CHS u ludzi jest alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ACD – allergic contact dermatitis). Stale rosnąca liczba osób cierpiących na schorzenia alergiczne, stwarza coraz większe problemy natury społeczno-ekonomicznej odbijając się na jakości życia pacjentów, a tym samym na wydajności pracy. Kontaktowe zapalenie skóry powstające w wyniku ekspozycji na substancje chemiczne w miejscu pracy to prawie 30% wszystkich chorób zawodowych, w tym aż 80% z tych chorób dotyczy skóry rąk [28].

Liczba czynników etiologicznych ACD jest bardzo duża, w samym przemyśle stosuje się ponad 100 000 substancji chemicznych, a każdego roku syntetyzuje się 2000 nowych. Dotąd zidentyfikowano ponad 3700 cząsteczek, które mogą być alergenami kontaktowymi [77]. Do substancji powszechnie wywołujących uczulenia kontaktowe u ludzi zaliczamy: jony metali ciężkich (chrom, nikiel, żelazo,

kobalt), lateks, terpentynę, substancje zapachowe oraz konserwujące zawarte w kosmetykach (np. p-fenylendwuamina), niektóre leki (np. neomycyna, benzokaina, penicylina), substancje chemiczne wytwarzane przez rośliny (pentadekakatechol – substancja zawarta w bluszczu trującym), a także hydrochinon – używany w przemyśle fotograficznym [49,65].

Reakcja CHS u zwierząt doświadczalnych

Wiedza na temat patofizjologii ACD pochodzi głównie z badań przeprowadzonych z zastosowaniem modeli zwierzęcych, w których wywołuje się indukowane haptunami zapalenie skóry, tzw. reakcję nadwrażliwości kontaktowej. Reakcję taką można wywołać u myszy, świnek morskich [108] oraz szczurów [83].

U zwierząt doświadczalnych, w tym również u myszy, reakcję CHS wywołuje się przez aplikację roztworu haptenu w rozpuszczalniku organicznym na ogoloną skórę [9]. Do najczęściej używanych haptenu należą: chlorek pikrylu (PCI; TNP-Cl – chlorek trinitrofenylu, TNCB – trinitrochlorobenzen), dinitrofluorobenzen (DNFB), dinitrochlorobenzen (DNCB) oraz oksazon (OX).

W zależności od szczepu myszy oraz rodzaju haptenu użytego do immunizacji, reakcja CHS może przebiegać przy współudziale swoistych limfocytów pomocniczych Th1 CD4⁺ lub swoistych limfocytów cytotoksycznych Tc1 CD8⁺. Pierwszy typ odpowiedzi można indukować immunizując myszy szczepu CBA/J o haplociepie H-2^k haptenu TNP-Cl [6,46]. Natomiast reakcję, w której funkcję efektorową pełnią limfocyty Tc1 można wywołać u myszy szczepu C57BL/6 (haplotyp H-2^b) aplikując na ogoloną skórę TNCB, DNFB, DNCB lub OX oraz u myszy szczepu BALB/c (haplotyp H-2^d) podając na skórę DNFB, DNCB lub OX [13,14,26,38,57,76,93,135]. Jednak według niektórych doniesień nie można wywołać odpowiedzi spolaryzowanej w jednym kierunku, a komórki efektorowe Th1 CD4⁺ i Tc1 CD8⁺ współuczestniczą w reakcji, jak to się dzieje np. u myszy szczepu C57BL/6 uczulonych DNFB lub OX [125].

MECHANIZM REAKCJI NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

Reakcja CHS, bez względu na rodzaj komórek efektorowych, przebiega w dwóch kolejno po sobie występują-

958

CD1a [16,17,27]. Komórki te już po siedmiu minutach od immunizacji wydzielają IL-4, która stymuluje swoiste antygenowo limfocyty B-1. Limfocyty B-1 (zwane komórkami fazy wczesnej) o fenotypie $\text{Thy1}^+ \text{CD5}^+ \text{CD3} - \text{CD4} - \text{CD8}$ – ulegają aktywacji w jamie otrzewnej już w pierwszej godzinie od immunizacji haptentem, przez stymulację IL-4 oraz kompleksem haptent-białko [9,50,116]. Następnie komórki B-1 wędrują do śledziony i miejscowych węzłów chłonnych, gdzie w ciągu jednego dnia przekształcają się w komórki syntetyzujące IgM, swoiste dla użytego haptentu TNP-Cl [52].

W modelu reakcji CHS zależnej od komórek CD8^+ również występuje podobny mechanizm inicjacji reakcji CHS. Z dotychczasowych doniesień wynika, że naskórna aplikacja haptentu DNFB (u myszy szczepu BALB/c) powoduje powstanie komórki fazy wczesnej o unikalnym fenotypie $\text{Thy1}^+ \text{CD5}^+ \text{CD3} - \text{CD4} - \text{CD8}^+$, która jest swoista antygenowo i ulega pełnej aktywacji w obecności IL-4 uwalnianej przez limfocyty NKT [8,51]. Wykazano także, że w reakcji CHS Tc1-zależnej istotną rolę odgrywają również limfocyty $\text{TCR}\gamma\delta^+$.

Hapteny

Hapteny są niskocząsteczkowymi substancjami (mniej niż 1 kD), a ich przenikanie przez naskórek zależy głównie od polarności cząsteczki, następuje szybciej dla cząsteczek lipofilnych a wolniej dla haptentów hydrofilnych [11]. Hapteny nie są immunogenne, dopiero po kowalencyjnym bądź niekowalencyjnym połączeniu z białkami naskórka, tworzą kompleksy zwane neoantygenami i wtedy nabywają immunogenności. Większość haptentów jest cząsteczkami elektrofilowymi, które łączą się z resztami nukleofilowymi białek znajdujących się w naskórku [70]. Jony metali nie wiążą się kowalencyjnie, lecz tworzą słabe połączenia z resztami aminokwasowymi białek. Wiele haptentów występuje w postaci nieaktywnych prohaptentów, które wymagają dodatkowego metabolizmu *in vivo* w naskórku, często z użyciem enzymów (m.in. cytochrom P-450, dehydrogenaza alkoholowa, oksydaza aminowa, dehydrogenaza aldehydowa) [56]. Przykładem są niektóre sole metali, które ulegają przekształceniu chemicznemu w skórze, np. sześciowartościowa sól chromu przekształcona w trójwartościową staje się wysoce reaktywną postacią zdolną wiązać się z białkami [98]. Natomiast poliaromatyczny węglowodór dimetylobenzantracen (DMBA), p-fenylenodwuamina oraz substancje fotouczulające muszą być aktywowane przez promieniowanie UV, by wiązać się z białkami naskórna [4,10].

Jeszcze nie ustalono dlaczego niektóre hapteny preferencyjnie dają odpowiedź Th1 lub Tc1-zależną. Hapteny mogą się wiązać z białkami występującymi pozakomórkowo lub mogą się przyłączać do białek powierzchniowych na komórkach, następnie zostać pochłonięte i przetworzone wewnątrz przedziału endosomalno-lizosomalnego i zaprezentowane z MHC klasy II limfocytom CD4^+ . Natomiast aż kilka mechanizmów może się przyczyniać do tego, że hapteny zostaną zaprezentowane komórkom Tc1.

Hapteny hydrofobowe rozpuszczalne w tłuszczach mogą przenikać przez błonę komórkową i łączyć się z białkami w cytoplazmie, a następnie być prezentowane z MHC klasy I, np. DNFB oraz substancja zawarta w bluszczu trującym – pentadekakatechol [55]. Alternatywnie, hapteny mogą się wiązać do białek pozakomórkowych, które mają odpowiednią konformację cząsteczkową, aby być pochłaniane przez fagolizosomy, a następnie prezentowane przez molekuły MHC klasy I [92]. Ponieważ hapteny łączą się z resztami aminokwasowymi jest również możliwe, że część haptentów może bezpośrednio wiązać się do peptydów wewnątrz rowka wiążącego MHC klasy I lub II, bez wcześniejszego przetwarzania wewnątrzkomórkowego [99,133]. Nikiel natomiast może zachowywać się jak superantygen i być bezpośrednio wiązany do receptora TCR/MHC, poza rowkiem wiążącym [19,36,82].

Hapteny zostały sklasyfikowane ze względu na możliwość wywołania reakcji ACD u człowieka. Silne hapteny (np. OX lub DNFB), zazwyczaj wywołują reakcje nadwrażliwości u wszystkich ludzi. Natomiast większość kontaktowych alergenów zalicza się do słabych haptentów, które wywołują ACD jedynie u około 5% osób dla soli metali i poniżej 0,01% dla substancji, takich jak p-fenylenodwuamina czy eugenol [64]. Nie wiadomo skąd wynika różnica w zdolności haptentów do generowania CHS.

Reakcja nadwrażliwości kontaktowej dla słabych i średnich haptentów może się rozwinąć po latach ciągłej ekspozycji na dany związek uczulający. Natomiast dla silnych haptentów można wywołać reakcję już po pierwszym kontakcie z haptentem, tzw. pierwotna ACD. Reakcja ta ma identyczny przebieg jak w klasycznej CHS składającej się z fazy indukcyjnej i efektorowej [95].

Pochłanianie antygenów, dojrzewanie i migracja komórek dendrytycznych

W reakcji CHS biorą udział dwa rodzaje komórek dendrytycznych (DC – dendritic cells): komórki Langerhansa (LC – Langerhans cells) występujące w naskórku oraz skórne komórki dendrytyczne (DDC – dermal dendritic cells) w skórze właściwej [58]. Jednak dokładny udział w wywołaniu fazy indukcyjnej oraz fenotyp komórki DDC nie jest do końca poznany. Komórki LC ulegają funkcjonalnej przemianie z komórki rozpoznającej i pochłaniającej antygen w dojrziałą komórkę DC prezentującą antygen, o silnych właściwościach immunostymulujących [22]. W reakcji zależnej od komórek Tc1 komórki dendrytyczne wykazują fenotyp MHC klasy I/II⁻ [63,66].

Naskórna aplikacja haptentu jest czynnikiem wywołującym mobilizację i migrację komórek dendrytycznych ze skóry do węzłów chłonnych [68]. Zaledwie po piętnastu minutach od aplikacji haptentu komórki LC zostają pobudzone do syntetyzowania mRNA IL-1 β [31]. Wydzielana IL-1 β działa autokrynnie na komórki LC przez receptor IL-1RI oraz pobudza keratynocyty do syntezy GM-CSF oraz TNF- α , który wiążąc się z receptorem TNF-R2 na komórkach LC jest sygnałem do wędrówki tych

komórek z naskórka do węzłów chłonnych [25,32,126]. W naskórku komórki LC pozostają w kontakcie z keratynocytami za pośrednictwem E-kadheryn. Połączenie TNF- α i IL-1 β z ich receptorami na LC obniża ekspresję E-kadheryn i cząsteczek adhezyjnych w błonie komórkowej LC powodując utratę połączeń z otaczającymi keratynocytami oraz nawiązanie interakcji ze strukturami błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej tkanki łącznej [24,45]. Niektóre badania dowodzą, że nadrzędną cytokiną odpowiedzialną za migrację LC aktywowanych haptenem do węzłów chłonnych nie jest IL-1 β i TNF- α , lecz IL-18, która może być wydzielana przez keratynocyty lub komórki LC [5].

Najnowsze badania wskazują, że główną rolę w wywołaniu reakcji CHS odgrywają receptory TLR2 i TLR4 (Toll like receptors) [78]. Hapteny po rozpoznaniu i aktywacji mechanizmów obrony wrodzonej powodują uwalnianie wolnych rodników tlenowych (ROS) oraz ATP. ROS generują rozpad kwasu hialuronowego na niskocząsteczkowe produkty, które aktywują receptory TLR2 i TLR4 obecne na komórkach DC, a w konsekwencji powstają nieaktywne postaci pro-IL-1 β i pro-IL-18 [101]. Cząsteczki ATP natomiast zostają rozpoznane przez receptor purynergiczny P2X7 i aktywują inflammasom (wewnątrzkomórkowy kompleks białek), czego skutkiem jest aktywacja kaspazy 1, która przekształca pro-IL-1 β oraz pro-IL-18 w aktywne postaci cytokin [129]. Keratynocyty również wykazują ekspresję receptorów TLR i wydzielają IL-1 β i IL-18 z udziałem inflammasomu [23].

Aby LC mogły przeniknąć z naskórka do skóry właściwej i potem do węzłów chłonnych wydzielają enzymy, metaloproteiny MMP3 i MMP9, które powodują degradację cząsteczek adhezyjnych i trawienie białek błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej [62]. Po rozluźnieniu połączeń z keratynocytami, LC wydłużają wypustki dendrytyczne i „prześlizgują się” między komórkami naskórka w kierunku błony podstawnej [102]. Metaloproteiny są również odpowiedzialne za przejście E-kadheryn i pro-TNF- α w postaci aktywne biologicznie. Kiedy LC znajdują się w skórze właściwej następuje wzrost ekspresji receptora chemokinowego CCR7, dla którego ligandami są chemokiny MIP-3 β (CCL19) i SCL (CCL21). Interakcja między CCL21 i CCR7 jest niezbędna by komórki LC przedostały się do aferentnych naczyń limfatycznych i dalej jako komórki welonowate dotarły wraz z limfą do strefy przykorowej węzłów chłonnych, gdzie przekształcają się w komórki dendrytyczne splatające [124].

Obecność w otoczeniu TNF- α i IL-1 β powoduje wzrost ekspresji molekuł adhezyjnych, tj. CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), α 6 integryny i różnych izoform CD44, które zapewniając interakcje LC z macierzą pozakomórkową umożliwiają migrację komórkom LC. Czynniki odpowiedzialne za migrację LC są zaangażowane również w proces dojrzewania tych komórek. Ekspresja receptorów, takich jak receptor mannozowy, FcR i CD1a spada podczas dojrzewania komórek LC, zanikają również ziarnistości Birbecka, a mechanizm odpowiedzialny za makropinocyto-

zę i fagocytozę antygenów jest blokowany. Dochodzi do wzrostu ekspresji antygenów zgodności tkankowej MHC klasy I i II, molekuł kostymulujących: CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40 i receptorów chemokinowych CCR4, CCR7, CXCR4 na powierzchni LC [21,69].

Wspomniane komórki dendrytyczne przetwarzają i prezentują antygen limfocytom T. Antygeny, które powstają wewnątrzkomórkowo są przetwarzane i prezentowane z MHC klasy I, limfocytom TCR $\alpha\beta$ CD8 $^{+}$. Zdenaturowane z białka cytoplazmatyczne łączą się z ubikwitiną i w proteasomach są degradowane do peptydów o długości 8-10 aminokwasów. Dalej są transportowane przez retikulum endoplazmatyczne, aby połączyć się z MHC I. Transport odbywa się z udziałem produktów genów TAP-1 i TAP-2. Następnie kompleksy peptyd – MHC I są przenoszone na powierzchnię komórki APC przez aparaty Goldiego i prezentowane naiwnym limfocytom T [54].

Indukcja limfocytów T efektorowych CHS

Cyrkulujące naiwne limfocyty CD4 $^{+}$ i CD8 $^{+}$ przechodzą do strefy parakortycznej węzła chłonnego przez kapilary z wysokim śródbłonkiem (HEV) w odpowiedzi na chemokiny wydzielane przez komórki DC [2]. Aktywacja naiwnych limfocytów T wymaga dwóch sygnałów: interakcji receptora TCR z MHC z peptydem w rowku wiążącym oraz sygnału kostymulującego i sekrecji cytokin i chemokin wydzielanych przez komórki DC. Połączenie TCR z kompleksem peptyd-MHC I aktywuje czynnik NF- κ B, który reguluje transkrypcję genu dla IL-2, która jest główną cytokiną odpowiedzialną za proliferację i aktywację komórek T. Fizyczny kontakt między limfocytom T i komórką APC powoduje przebudowę błony komórkowej pozwalając na interakcję receptorów TCR-MHC i połączenie się molekuł kostymulujących. Błona komórkowa dojrziałych DC wykazuje wysoki poziom molekuł niezbędnych do aktywacji limfocytów T. Wśród cząstek zaangażowanych w interakcję komórek DC i limfocytów T są: CD40 łączący się z CD40L znajdującym się na limfocycie T, integryna CD54 łącząca się z LFA-1 (CD11a/CD18), CD58 łącząca się z CD2 oraz lektyna DC-SIGN (CD209) łącząca się z ICAM-3/2 [96]. Następnie aktywowane limfocyty T proliferują i różnicują się w komórki pamięci oraz komórki TCR $\alpha\beta$ CD8 $^{+}$ (Tc1) efektorowe fazy później reakcji CHS. Komórki efektorowe pojawiają się po około pięciu dniach od depozycji haptenu na skórze.

Migracja limfocytów T efektorowych do krwi i skóry

Jeśli limfocyty T zostaną zaktywowane emigrują z węzłów chłonnych przez eferentne naczynia limfatyczne do krwiobiegu, to jest związane z wydzielaniem chemokin i modyfikacją ekspresji receptorów adresyn. Uczulone limfocyty T mogą się stać komórkami efektorowymi, które migrują do miejsca zapalenia lub komórkami pamięci, które cyrkulują w organizmie nawet latami, aż przy kolejnym kontakcie z haptenem staną się komórkami efektorowymi.

Powstają dwa typy komórek T pamięci: pierwszym typem pamięci obwodowej są komórki T niemające receptora CCR7. Są to limfocyty, które występują w skórze i krwi, natomiast nie mogą recyrkulować do węzłów chłonnych. Przy kolejnym kontakcie z haptenem, działają natychmiast jako komórki efektorowe wydzielając IFN- γ . Migracja komórek T z krwi do skóry wymaga interakcji między receptorami CLA i CCR4 z ich ligandami E – i P-selektyną oraz TARC (CCL17) znajdującymi się na komórkach endotelialnych. Konieczna jest również interakcja między VLA-4 i LFA-1 na limfocycie T z VCAM-1 i ICAM-1 na komórkach endotelialnych [15]. Drugi rodzaj pamięci, to pamięć centralna, związana z limfocytami T, które zawierają receptor CCR7 i mogą recyrkulować do węzłów chłonnych, lecz nie mogą być rekrutowane do tkanek. Limfocyty te mają za zadanie stymulować komórki dendrytyczne i przy kolejnym kontakcie z antygenem przekształcają się w komórki CCR7 – [97].

Faza efektorowa reakcji CHS

Faza efektorowa reakcji CHS rozwija się w miejscu wywołania reakcji, tj. po powtórnej aplikacji haptenu w innym miejscu niż w czasie immunizacji. W reakcji tej można wyróżnić dwie kolejno po sobie występujące fazy: wczesną występującą już dwie godziny od kontaktu z haptentem, gdzie główną rolę odgrywają inicjujące limfocyty B-1, które pod wpływem IL-4 uwalnianej przez limfocyty NKT wydzielają przeciwciała IgM oraz fazę późną rozwijającą się po około 24 godzinach, a mediowaną przez efektorowe limfocyty TCR $\alpha\beta$ ⁺ [121].

W modelu reakcji CHS indukowanej haptentem TNP zależnej od komórek Th1 CD4⁺, wytworzone po uczuleniu przeciwciała IgM anty-TNP swoiście reagują z haptentem ponownie aplikowanym na skórę, tworząc kompleksy immunologiczne aktywujące układ dopełniacza w sposób klasyczny [113,115]. Podczas aktywacji komplementu dochodzi do powstania między innymi fragmentu C5a, który przez receptory znajdujące się w błonie komórkowej aktywuje mastocyty i płytki krwi prowadząc do uwolnienia wielu czynników naczynioruchowych (m.in. serotonina), cytokiny (TNF- α , GM-CSF), chemokiny, leukotrieny (LT) i prostaglandyny PGD₂ [9,37,114]. Czynniki te stymulują endotelium do ekspresji molekuł adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1, co ułatwia tocznienie się, adhezję i przechodzenie krążących limfocytów T do miejsca zapalenia [79]. Limfocyty B-1 dodatkowo rekrutują do miejsca zapalenia limfocyty TCR $\gamma\delta$ ⁺, które prawdopodobnie powstają w śledzionie podczas fazy indukcyjnej i są komórkami asystującymi limfocytom TCR $\alpha\beta$ efektorowym [7,85]. Ich funkcja nie jest wyjaśniona, ale wiadomo, że są komórkami niezbędnymi do powstania pełnej odpowiedzi zapalnej. W modelu reakcji CHS zależnej od limfocytów Tc1 CD8⁺ zachodzą takie same procesy inicjujące fazę efektorową jak w modelu CHS Th1 zależnej [8,12,51,111,112].

Przyciąganie cyrkulujących limfocytów T z naczyń następuje dzięki interakcji L-selektyny i receptorów zasiedlania CLA (cutaneous lymphocyte-associated antygen) na

limfocycie T z P – i E-selektyną na komórkach śródbłonka, powodując tocznienie się limfocytów po śródbłonku [91]. Adhezja komórek T do śródbłonka następuje dzięki interakcji integryny LFA-1 (CD11a/CD18) z receptorem ICAM-1 (CD54) na śródbłonku i VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) z VCAM-1. To zatrzymuje komórki T na śródbłonku, które następnie migrują do skóry właściwej i dalej do miejsca depozycji haptenu [128].

Limfocyty Tc1 efektorowe po rozpoznaniu antygeny w MHC klasy I na komórkach LC uwalniają wiele cytokin w tym m.in. IFN- γ . Wydzielony IFN- γ wzmacnia wytwarzanie w skórze: IP-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF i MIP-2 (CXCL8), które wywołują masywny napływ neutrofilów, komórek DC oraz monocytów, przekształcających się w makrofagi [44,136]. Uwolniony przez limfocyty T CD8⁺ IFN- γ aktywuje miejscowo występujące makrofagi, a przez to uwalnia wolne rodniki tlenowe (ROS).

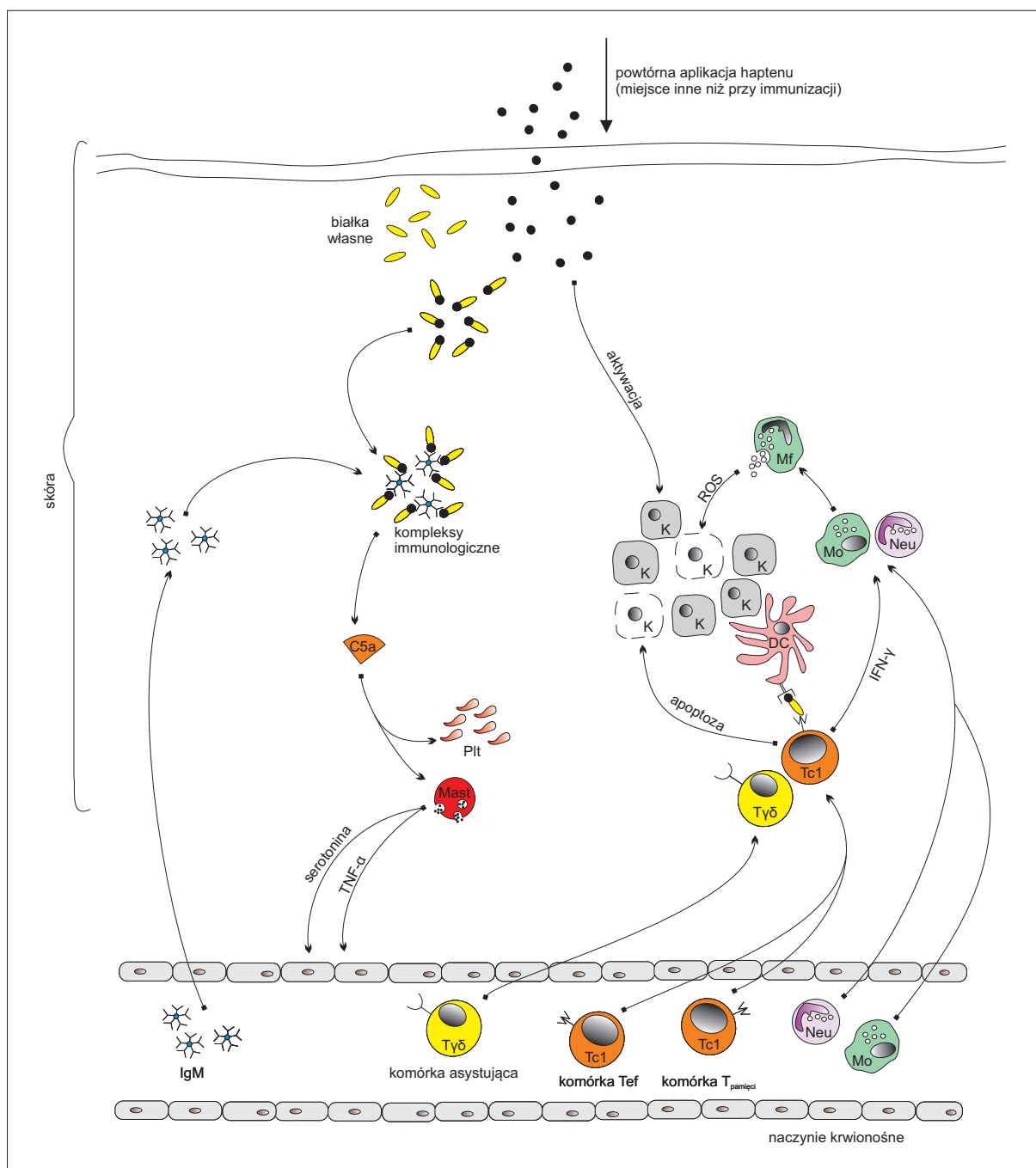
Obecność haptenu nie tylko powoduje rekrutację komórek efektorowych T, ale także aktywuje komórki rezydujące w skórze, m.in. keratynocyty, które są głównym źródłem GM-CSF, TNF- α i IL-1 β [18]. Keratynocyty wydzielają także chemokinę CXCL1, która jest chemoatraktantem neutrofilów. Intensywność napływu neutrofilów wpływa na liczbę limfocytów efektorowych Tc1, które są rekrutowane do miejsca zapalenia, a tym samym wpływa to na intensywność reakcji CHS [30]. Według ostatnich ustaleń miejscowo występujące mastocyty, są ważnymi komórkami regulatorowymi odpowiedzialnymi za wzmocnienie zapalenia. Mastocyty wytwarzają TNF- α i MIP-2, które są niezbędne do rekrutacji neutrofilów [12]. Niektórzy donoszą także, że oprócz IFN- γ ważną rolę w reakcji CHS odgrywa IL-17A, która jest wydzielana przez komórki CD8⁺ T_{IL-17}. Cytokina ta prawdopodobnie jest odpowiedzialna za rekrutację neutrofilów do miejsca zapalenia [47,118].

Ponadto w czasie reakcji CHS, komórki CD8⁺ ujawniają swoją cytotoksyczność przez interakcję białek Fas/FasL oraz wyrzut perforyn i grzymów [57,59,110]. Głównym celem ataku cytotoksycznego są keratynocyty znajdujące się w miejscu zapalenia, które uczestniczą w procesie apoptozy [3]. Uszkodzenie naskórka ułatwia penetrację haptenu obecnego w skórze, który wzmacnia zapalenie. Perforyny, uwolnione przez limfocyty CD8⁺ przyczyniają się do wytwarzania RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β , które mediuje rekrutację monocytów i granulocytów [123].

Wynikiem opisanych zmian w miejscu reakcji jest zaczerwienienie i obrzęk. Natomiast za powolne ustępowanie objawów zapalenia odpowiedzialne są komórki T regulatorowe (Treg) CD4⁺, które limitują uszkodzenia.

REGULACJA REAKCJI NADWRAŻLIWOŚCI KONTAKTOWEJ

Reakcja CHS mediowana przez komórki Tc1 CD8⁺, które wydzielają IFN- γ jest negatywnie regulowana przez limfocyty T CD4⁺, co potwierdzono w wielu ośrodkach naukowych na różnych modelach zwierzęcych, m.in. odpowiedź myszy szczepu BALB/c na hapteny DNFB i OX, czy też reakcja u myszy szczepu C57BL/6 na immunizację TNCB



Ryc. 2. Schemat wywołania fazy efektorowej reakcji CHS Tc1 zależnej (kolejny kontakt z haptenem). C5a – fragment dopełniacza; DC – komórka dendrytyczna; K – keratynocyt; Mast – mastocyt; Mf – makrofag; Mo – monocyty; Neu – neutrofil; Plt – płytki krwi; Tc1 – limfocyt cytotoksyczny typu 1; Tyδ – limfocyt γδ

lub DNFB [1,29,38,61,90]. Komórki regulatorowe (Treg) $CD4^+$ regulują długość i nasilenie reakcji CHS i działają w fazie indukcyjnej i efektorowej odpowiedzi. Wykazano, że komórki $CD8^+$ wytwarzają IL-2, która jest niezbędna do funkcjonowania komórek Treg $CD4^+CD25^+$ [60].

Komórki T efektorowe (Tef) $CD8^+$ oraz komórki Treg $CD4^+$ powstają w fazie indukcyjnej reakcji CHS przez kontakt z tymi samymi komórkami prezentującymi antygen. Jednak komórki Treg $CD4^+$ i Tef $CD8^+$ powstają niezależnie od

siebie [94,135]. Inne badania wykazały, że komórki DC, które aktywują komórki regulatorowe muszą zawierać na swojej powierzchni antygeny zgodności tkankowej MCH klasy II [66]. Najnowsze badania nad regulacją reakcji CHS wykazały, że komórka regulacyjna ma fenotyp $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ oraz że jest aktywowana w fazie indukcji podczas immunizacji haptenem. W fazie indukcji odpowiedzi komórki Treg eliminują komórki DC w procesie apoptozy zależnej od interakcji Fas-FasL [41]. Dojrzałe komórki DC, prezentujące pochłonięte kompleksy haptenu-

-białko w węzłach chłonnych wykazują ekspresję molekuly Fas, podczas gdy populacja komórek Treg ma receptor FasL. Następstwem interakcji Fas – FasL jest spadek liczby komórek DC zdolnych do indukcji komórek Tef [40,42]. W innym ośrodku naukowym wykazano, że reakcja CHS na hapten DNFB jest regulowana przez komórki Treg swoiste antygenowo, które mają wysoką ekspresję markera ICOS i wydzielają IFN- γ , IL-10 oraz IL-17 [122].

Inne badania wykazały, że komórki regulatorowe znajdujące się w węzłach chłonnych hamują reakcję CHS w fazie indukcji przez nawiązanie szczelinowych połączeń międzykomórkowych z komórkami DC (gap junctions). Komunikacja ta powoduje przepływ przekaźników m.in. cAMP i jonów wapnia, co powoduje obniżenie ekspresji molekuł kostymulujących CD86 na powierzchni komórek DC znosząc aktywację i proliferację limfocytów T CD8⁺ [88].

Gorbachev i wsp. wykazali, że monoklonalne przeciwciała anty-CD154 hamuje rozwój komórek CD8⁺. Reakcja ta nie polega na bezpośrednim blokowaniu interakcji między białkiem kostymulującym CD40 obecnym na komórkach DC, a receptorem CD154 obecnym na komórkach T, lecz mechanizm ten jest związany z pośrednim oddziaływaniem mAb anty-CD154 na komórki regulatorowe, które ograniczają zdolność komórek DC do aktywowania komórek T CD8⁺ [43].

W fazie efektorowej CHS następuje szybka rekrutacja komórek CD8⁺ Tef, a następnie obserwowany jest powolny napływ komórek CD4⁺ Treg, odpowiedzialnych za hamowanie objawów zapalenia. Różny przypływ limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ może wynikać z różnej ekspresji receptorów chemokinowych przez wspomniane komórki. Rekrutacja komórek Tc1 jest pod kontrolą IP-10 (CXCL10), podczas gdy rekrutacja limfocytów CD4⁺ jest pod kontrolą MDC (CCL22) oraz TARC (CCL17) i ich receptora CCR4 na aktywowanych limfocytach T CD4⁺ [96].

Komórki Treg CD4⁺CD25⁺ w fazie efektorowej reakcji CHS Tc1 zależnej, wywołanej haptenem TNCB hamują reakcję zapalną ograniczając napływ leukocytów do miejsca toczącej się reakcji zapalnej. Ograniczenie napływu leukocytów do miejsca zapalenia jest wynikiem upośledzenia procesu toczenia i przylegania leukocytów do komórek śródbłonna naczyń [90]. Wykazano również, że kontakt bezpośredni między komórką Tef, a komórką Treg nie jest konieczny do osiągnięcia supresji, natomiast niezbędna jest obecność IL-10. Możliwe, że IL-10 hamuje interakcje adhezyjne leukocyt/endotelium przez spadek ekspresji E-selektyny lub powoduje spadek wydzielania TNF- α w miejscu zapalenia, co następnie ogranicza ekspresję ICAM-1 na śródbłonnku. Kolejne badania tego samego zespołu wykazały, że naturalnie występujące komórki Treg CD4⁺CD25⁺ hamują reakcję CHS w fazie efektorowej przez uwalnianie adenozyiny w wyniku interakcji CD39/CD73. Adenozyina hamuje ekspresję E – i P-selektyny uniemożliwiając tym samym adhezję leukocytów do śródbłonna [89].

Badania modelu Tc1-zależnej CHS indukowanej haptenem OX wykazały, że są dwie populacje komórek Treg

CD4⁺CD25⁺ i CD4⁺CD25⁻ – Tr1. Komórki Treg CD4⁺CD25⁺ wymagają bezpośredniego kontaktu z komórką Tef, lecz same nie wydzielają cytokin. Komórki te aktywują natomiast inną populację komórek regulacyjnych, zwaną komórkami Tr1, które wydzielają IL-10 oraz TGF- β [35]. W ludzkim modelu reakcji CHS na nikiel dowiedziono, że komórki regulatorowe Tr1, przez wydzielanie IL-10 blokują dojrzewanie i różnicowanie komórek DC oraz hamują wytwarzanie IL-12 [20]. Inni autorzy donoszą, że komórka regulacyjna Tr1 CD4⁺ działa przez wydzielanie IL-4 oraz IL-10 [34,136].

Mechanizmem regulującym negatywnie odpowiedź CHS jest supresja wywołana przez naskórną (EC) aplikację antygeny białkowego. Badania nad naskórną indukowaną supresją obejmują prowadzone przez nas badania i zagadnienia te zostaną szczegółowo omówione w dalszej części pracy.

W literaturze światowej jest niewiele doniesień na temat pozytywnej regulacji reakcji CHS zależnej od komórek Tc1. Wiadomo jedynie, że podanie mAb anty-IL-12 powoduje zahamowanie reakcji Tc1-zależnej, sugerując że IL-12 pełni istotną rolę w indukowaniu reakcji CHS [87]. Późniejsze badania potwierdziły tę hipotezę, udowadniając, że podawanie IL-12 podczas immunizacji haptenem znosi działanie supresyjne komórek Treg CD4⁺ nasilając i przedłużając czas trwania reakcji CHS [39].

TOLERANCJA POKARMOWA

Powszechnie wiadomo, że podanie antygeny na błony śluzowe lub drogą pokarmową, poza wywołaniem lokalnej odpowiedzi immunologicznej na śluzówkach prowadzi jednocześnie do powstania stanu tolerancji na obwodzie. Zjawisko to leży u podstaw tolerancji śluzówkowej (np. tolerancja pokarmowa) i zabezpiecza organizm przed indukcją odpowiedzi na antygeny niepatogenne. Doustne podanie niskiej dawki antygeny powoduje wystąpienie aktywnej supresji, natomiast traktowanie wysoką dawką antygeny wywołuje anergię klonalną i delecję limfocytów efektorowych [33]. Odmianą tolerancji śluzówkowej jest supresja wywołana podaniem antygeny donosowo. Jej mechanizm wydaje się podobny do tego, który występuje w tolerancji pokarmowej.

W wielu modelach zwierzęcych, stanowiących odpowiedniki ludzkich chorób autoimmunizacyjnych, bada się wpływ podawania autoantygenów drogą pokarmową na rozwój choroby. Stwierdzono, że podanie odpowiednich antygenów *per os* łagodzi przebieg eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia rdzenia kręgowego i mózgu (EAE), eksperymentalnego zapalenia stawów (CIA), zespołu antyfosfolipidowego, insulinozależnej cukrzycy (IDDM), eksperymentalnej autoimmunologicznej miastonii (EAMG) oraz eksperymentalnego zapalenia nerwów obwodowych (EAN). Jednak określenie mechanizmu tolerancji pokarmowej jest trudne, ze względu na różny wiek testowanych zwierząt, podłoże genetyczne, rodzaj mikroflory bakteryjnej, dawkę oraz strukturę podawanego antygeny. Skuteczność doustnego lub donosowego

podania antygeny w terapii testowano także u chorych na stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie błony naczyniowej oka oraz u pacjentów z alergią na nikiel [67].

Metale ciężkie, takie jak nikiel czy chrom mogą wywołać reakcję CHS. Wykazano, że można wytworzyć tolerancję pokarmową na te metale w modelu zwierzęcym u myszy oraz świnek morskich. Wytworzone komórki regulatorowe należą do populacji limfocytów T CD8⁺, są swoiste antygenowo i można je „przeszczepić” do naiwnych biorców. Stan areaktywności immunologicznej utrzymuje się co najmniej przez dwa lata [119,120]. U chorych z alergią na nikiel zaobserwowano osłabienie objawów chorobowych na skutek spadku swoistych antygenowo limfocytów T [132].

Dotychczasowe badania nad tolerancją pokarmową wykazały, że karmienie szczurów rasy Lewis małymi dawkami zasadowego białka mieliny (MBP) hamuje rozwój EAE powodując powstanie komórek regulacyjnych CD8⁺, które hamują komórki efektorowe Th1. Badania te potwierdzono na myszach transgenicznym, wykazując, że powstające komórki regulatorowe należą do populacji CD8⁺ i CD4⁺. Opisane komórki regulatorowe są identyczne pod względem budowy TCR oraz restrykcji MHC z komórkami efektorowymi Th1, lecz wydzielają cytokiny przeciwzapalne (TGF-β, IL-4, IL-10), które hamują działanie komórek efektorowych [131,134].

Wykazano też, że doustne podanie niskiej dawki DNFB, poprzedzające skórną immunizację DNFB powoduje zahamowanie reakcji CHS przez wytworzenie komórek regulacyjnych CD4⁺, które osłabiają rozwój komórek CD8⁺ Tef w węzłach chłonnych [26].

Podawanie dużych dawek antygeny drogą pokarmową powoduje przenikanie antygeny do krążenia w postaci natywnej lub jedynie częściowo zmienionej. U myszy traktowanych dużymi dawkami ovalbuminy (OVA) obserwuje się delecję klonów swoistych antygenowo limfocytów T. Ponadto pod wpływem dużych dawek antygeny powstają limfocyty regulatorowe CD4⁺, które są nieswoiste antygenowo, wykazują dużą ekspresję molekuly FasL oraz wydzielają IL-10 i TGF-β. Prawdopodobnie komórki te powstają w wątrobie lub tkance limfatycznej przewodu pokarmowego (GALT) [130].

W zwierzęcym modelu kolagenowego zapalenia stawów (CIA), podanie kolagenu typu II (COLL II) drogą pokarmową przed wywołaniem choroby, powoduje powstanie w węzłach Peyera limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Wspomniane komórki regulatorowe hamują syntezę IFN-γ oraz przeciwciał IgG2a, przy jednoczesnym wzroście wytwarzania przeciwciał o izotypie IgG1. Ponadto u zwierząt traktowanych COLL II zaobserwowano powstanie limfocytów Th2, wytwarzających IL-4 i IL-10 oraz limfocytów Th3 wydzielających TGF-β [80]. Podobne skutki zaobserwowano po podaniu myszom COLL II donosowo [100]. Niestety pozytywne wyniki badań na zwierzętach nie przyniosły efektów u ludzi. Prawdopodobnie obserwo-

wany brak działania terapeutycznego jest spowodowany różną budową układu pokarmowego, inną budową COLL II w zależności od gatunku, a także może wynikać z różnic w dawce podawanego antygeny [109].

TOLERANCJA IMMUNOLOGICZNA INDUKOWANA NASKÓRNĄ APLIKACJĄ ANTYGENY BIAŁKOWEGO

Skórę przez wiele lat uważano za miejsce, w którym stosunkowo łatwo można indukować silną odpowiedź immunologiczną, a jej klasycznym przykładem jest reakcja CHS, podczas gdy skóra jako miejsce, w którym można indukować tolerancję nie poświęcano większej uwagi [116]. Ponieważ skóra i błony śluzowe pełnią podobną funkcję w organizmie, jest prawdopodobne, że naskórna (EC) aplikacja antygeny – poza wywołaniem miejscowej odpowiedzi immunologicznej – może również indukować stan tolerancji na obwodzie przy spełnieniu określonych warunków immunizacji. Wykazano, że u myszy EC podanie białka ovalbuminy (OVA) wywołuje alergiczne zapalenie skóry z udziałem limfocytów Th2 wydzielających IL-4 [127]. Ponadto zaobserwowano, że EC immunizacja antygenem białkowym prowadzi do rozwoju astmy u myszy [48]. W oparciu o wspomniane obserwacje można przypuszczać, że aplikacja antygeny białkowego na skórę przy spełnieniu odpowiednich warunków immunizacji może indukować powstawanie komórek T wytwarzających cytokiny przeciwzapalne, zdolne do zahamowania odpowiedzi Th1 zależnej.

Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że EC aplikacja antygeny białkowego w postaci opatrunku z gazy lub emulsji w kremie wywołuje stan tolerancji, prowadzący do zahamowania odpowiedzi komórkowej na TNP w modelu CHS CD4⁺ Th1 zależnej [86,103,104,105]. Supresja reakcji CHS wywołana EC podaniem antygeny białkowego nie wykazuje swoistości antygenowej i jest wynikiem działania limfocytów TCRαβ⁺CD4⁺CD8⁺ działających regulacyjnie za pośrednictwem uwalnianego TGF-β [106].

Dalsze badania schorzeń autoimmunizacyjnych prowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, że EC aplikacja antygeny białkowego hamuje rozwój oraz łagodzi przebieg EAE [73,74,107,117] i CIA [71,137]. Co więcej, supresja indukowana przez skórę jest równie skuteczna w spowolnieniu reakcji odrzucania przeszczepu [72]. Skuteczność naskórnego podania antygeny w terapii testowano także u chorych na stwardnienie rozsiane (MS). Pacjentom aplikowano naskórną peptydy mieliny, co powodowało aktywację komórek DC w skórze oraz powstanie unikalnej populacji komórek DC w węzłach chłonnych. Ponadto zaobserwowano powstanie komórek T_{R1}, które silnie hamowały autoreaktywne limfocyty T skierowane przeciw antygenom mieliny za pośrednictwem uwalnianej IL-10 [53].

MECHANIZMY NASKÓRNE INDUKOWANEJ SUPRESJI REAKCJI CHS ZALÉŻNEJ OD LIMFOCYTÓW Tc1 CD8⁺

We wszystkich opisanych dotychczas układach badanych testowano skuteczność EC indukowanej tolerancji w negatywnej regulacji odpowiedzi CHS CD4⁺ Th1-zależnej.

W celu zbadania możliwości negatywnej regulacji reakcji CHS Tc1-zależnej przez EC immunizację antygenem, posłużono się reakcją kontaktową indukowaną DNFB [40,59]. Przeprowadzony cykl badań wykazał, że EC aplikacja antygeny DNP-BSA przed aktywnym uczuleniem DNFB, hamuje reakcję CHS *in vivo*. Obserwowane zmniejszenie obrzęku uszu korelowało z obniżoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych, spadkiem przyrostu „masy uszu” oraz spadkiem stężenia IFN- γ oraz aktywności MPO w homogenatach biopłatów usznych. Wyniki te zostały potwierdzone w teście *in vitro*, wykazując, że EC aplikacja antygeny białkowego hamuje proliferację komórek T efektorowych (Tef) CHS. Dodatkowo wykazano, że EC aplikacja DNP-BSA przed uczuleniem DNFB hamuje wytwarzanie IFN- γ , IL-12 oraz TNF- α . Opisany stan tolerancji utrzymuje się przez trzy tygodnie od chwili indukcji [138].

Badania z wykorzystaniem czterech niereagujących ze sobą krzyżowo antygenów: DNP-BSA, MBP, OVA oraz OX-Ig wykazały, że zjawisko supresji indukowanej naskórną aplikacją haptenu jest antygenowo nieswoiste [139].

W kolejnym etapie badań stosując model „transferu in” oraz model „transferu out” reakcji CHS wykazano, że EC podanie antygeny białkowego prowadzi do powstania komórek Treg w węzłach chłonnych pachowych i pachwinowych, śledzionie oraz grasicy. Dalsze badania wykazały, że podanie komórek regulacyjnych zarówno przed indukcją

reakcji CHS jak również przed jej wywołaniem powoduje zahamowanie odpowiedzi kontaktowej.

W wyniku „negatywnej selekcji”, analizy cytofluorymetrycznej oraz wykorzystując defektywne szczepy myszy TCR $\delta^{-/-}$ (myszy niemające limfocytów T z receptorem TCR $\gamma\delta$), CD1d $^{-/-}$ (myszy niemające limfocytów NKT CD1d zależnych), oraz $\beta_2m^{-/-}$ (myszy, u których brak limfocytów CD8) wykazano, że komórką odpowiedzialną za opisywany fenomen supresji jest limfocyt Treg o fenotypie TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ CD25 $^+$ Foxp3 $^+$. W badaniach nad mechanizmem EC indukowanej supresji wykazano, że do zaistnienia supresji jest niezbędny bezpośredni kontakt między komórką Treg-Tef i hamowanie odpowiedzi odbywa się z udziałem molekuly CTLA-4. Czynniki rozpuszczalne, takie jak cytokiny przeciwzapalne: IL-4, IL-10, IL-17E oraz TGF- β nie są zaangażowane w opisywany mechanizm supresji [75].

Podsumowując, EC aplikacja antygeny białkowego, przed aktywnym uczuleniem haptenu, prowadzi do zahamowania reakcji CHS zależnej od limfocytów Tc1. Przedstawiona metoda wywołania stanu tolerancji przez EC aplikację antygeny DNP-BSA dzięki skuteczności i prostocie użycia oraz braku inwazyjności stwarza nowe możliwości hamowania odpowiedzi immunologicznej, co może być przydatne w opracowaniu nowych metod leczenia reakcji nadwrażliwości kontaktowej z udziałem limfocytów Tc1 CD8 $^+$.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abe M., Kondo T., Xu H., Fairchild R.L.: Interferon- γ inducible protein (IP-10) expression is mediated by CD8 $^+$ T cells and is regulated by CD4 $^+$ T cells during the elicitation of contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.*, 1996; 107: 360-366
- [2] Adema G.J., Hartgers F., Verstraten R., de Vries E., Marland G., Menon S., Foster J., Xu Y., Nooyen P., McClanahan T., Bacon K.B., Figdor C.G.: A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naïve T cells. *Nature*, 1997; 387: 713-717
- [3] Akiba H., Kehren J., Ducluzeau M.T., Krasteva M., Horand F., Kaiserlian D., Kaneko F., Nicolas J.F.: Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8 $^+$ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J. Immunol.*, 2002; 168: 3079-3087
- [4] Anderson C., Hehr A., Robbins R., Hasan R., Athar M., Mukhtar H., Elmetts C.A.: Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons. *J. Immunol.*, 1995; 155: 3530-3537
- [5] Antonopoulos C., Cumberbatch M., Mee J.B., Dearman R., Wei X.Q., Liew F.Y., Kimber I., Groves R.W.: IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis. *J. Leukoc. Biol.*, 2008; 83: 361-367
- [6] Asherson G.L., Ptak W.: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. I. Active sensitization and passive transfer. *Immunol.*, 1968; 15: 405-416
- [7] Askenase P.W.: Yes T cells, but three different T cells ($\alpha\beta$, $\gamma\delta$ and NK T cells) and also B-1 cells mediate contact sensitivity. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001; 125: 345-350
- [8] Askenase P.W., Majewska-Szczepanik M., Kerfoot S., Szczepanik M.: Participation of iNKT cells in the early and late components of Tc1 mediated DNFB contact sensitivity: cooperative role of $\gamma\delta$ -T cells. *Scand. J. Immunol.*, 2011; 73: 465-477
- [9] Askenase P.W., Szczepanik M., Itakura A., Kiener C., Campos R.A.: Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by V α 14 $^+$ NKT cells and B-1 B cells. *Trends Immunol.*, 2004; 25: 441-449
- [10] Basketter D., Dooms-Goossens A., Karlberg A.T., Lepoittevin J.P.: The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis*, 1995; 32: 65-73
- [11] Berard F., Marty J.P., Nicolas J.F.: Allergen penetration through the skin. *Eur. J. Dermatol.*, 2003; 13: 324-330
- [12] Biedermann T., Kneilling M., Mailhammer R., Maier K., Sander C.A., Kollias G., Kunkel S.L., Hültner L., Röcken M.: Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J. Exp. Med.*, 2000; 192: 1441-1452
- [13] Boulou A., Cavani A., Katz S.I.: Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.*, 1998; 111: 44-49
- [14] Bour H., Peyron E., Gaucherand M., Garrigue J.L., Desvignes C., Kaiserlian D., Revillard J.P., Nicolas J.F.: Major histocompatibility complex class I-restricted CD8 $^+$ T cells and class II-restricted CD4 $^+$ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur. J. Immunol.*, 1995; 25: 3006-3010
- [15] Campbell J.J., Haraldsen G., Pan J., Rottman J., Qin S., Ponath P., Andrew D.P., Warnke R., Ruffing N., Kassam N., Wu L., Butcher E.C.: The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*, 1999; 400: 776-780

- [16] Campos R.A., Szczepanik M., Itakura A., Akahira-Azuma M., Sidobre S., Kronenberg M., Askenase P.W.: Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Vα14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J. Exp. Med.*, 2003; 198: 1785-1796
- [17] Campos R.A., Szczepanik M., Itakura A., Lisbonne M., Dey N., Leite-de-Moraes M.C., Askenase P.W.: Interleukin-4-dependent innate collaboration between iNKT cells and B-1 B cells controls adaptive contact sensitivity. *Immunology*, 2006; 117: 536-547
- [18] Cavani A., Albanesi C., Traidl C., Sebastiani S., Girololoni G.: Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. *Trends Immunol.*, 2001; 22: 118-120
- [19] Cavani A., Mei D., Guerra E., Corinti S., Giani M., Pirrotta L., Puddu P., Girololoni G.: Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell response. Evidence for the presence of effector CD8+ and regulatory CD4+ T cells. *J. Invest. Dermatol.*, 1998; 111: 621-628
- [20] Cavani A., Nasorri F., Prezzi C., Sebastiani S., Albanesi C., Girololoni G.: Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and Nickel-specific Th1 immune responses. *J. Invest. Dermatol.*, 2000; 114: 295-302
- [21] Cella M., Sallusto F., Lanzavecchia A.: Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 1997; 9: 10-16
- [22] Chomiczewska D., Trznadel-Budżko E., Kaczorowska A., Rotsztejn H.: Znaczenie komórek Langerhansa w układzie immunologicznym skóry. *Pol. Merk. Lekarski*, 2009; 26: 173-177
- [23] Corsini E., Galli C.L.: Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. *Toxicology*, 2000; 142: 203-211
- [24] Cumberbatch M., Dearman R.J., Griffiths C.E., Kimber I.: Epidermal Langerhans cell migration and sensitization to chemical allergens. *APMIS*, 2003; 111: 797-804
- [25] Cumberbatch M., Dearman R.J., Kimber I.: Langerhans cells require signals from both tumor necrosis factor-α and interleukin-1β for migration. *Immunology*, 1997; 92: 388-395
- [26] Desvignes C., Etchart N., Kehren J., Akiba I., Nicolas J.F., Kaiserlian D.: Oral administration of hapten inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8+ T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4+ T cells. *J. Immunol.*, 2000; 164: 2515-2522
- [27] Dey N., Szczepanik M., Lau K., Majewska-Szczepanik M., Askenase P.W.: Stimulatory lipids accumulate in the mouse liver within 30 min of contact sensitization to facilitate the activation of naïve iNKT cells in a CD1d-dependent fashion. *Scand. J. Immunol.*, 2011; 74: 52-61
- [28] Diepgen T.L., Weisshaar E.: Contact dermatitis: epidemiology and frequent sensitizers to cosmetics. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2007; 21: (Suppl. 2): 9-13
- [29] Dubois B., Chapat L., Goubier A., Kaiserlian D.: CD4+CD25+ T cells as key regulators of immune responses. *Eur. J. Dermatol.*, 2003; 13: 111-116
- [30] Engeman T., Gorbachev A.V., Kish D.D., Fairchild R.L.: The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. *J. Leukoc. Biol.*, 2004; 76: 941-949
- [31] Enk A.H., Katz S.I.: Early events in the induction phase of contact sensitivity. *J. Invest. Dermatol.*, 1992; 99: 395-415
- [32] Enk A.H., Katz S.I.: Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 1398-1402
- [33] Faria A.M., Weiner H.L.: Oral tolerance. *Immunol. Rev.*, 2005; 206: 232-259
- [34] Ferguson T.A., Dube P., Griffith T.S.: Regulation of contact hypersensitivity by interleukin 10. *J. Exp. Med.*, 1994; 179: 1597-1604
- [35] Foussat A., Cottrez F., Brun V., Fournier N., Breittmayer J.P., Groux H.: A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *J. Immunol.*, 2003; 171: 5018-5026
- [36] Gamberdinger K., Moulon C., Karp D.R., van Bergen J., Koning F., Wild D., Pflugfelder U., Weltzien H.U.: A new type of metal recognition by human T cells: contact residues for peptide-independent bridging of T cell receptor and major histocompatibility complex by nickel. *J. Exp. Med.*, 2003; 197: 1345-1353
- [37] Geba G.P., Ptak W., Anderson G.M., Paliwal V., Ratzlaff R.E., Levin J., Askenase P.W.: Delayed-type hypersensitivity in mast cell-deficient mice. Dependence on platelets for expression of contact sensitivity. *J. Immunol.*, 1996; 157: 557-565
- [38] Gocinski B.L., Tigelaar R.E.: Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J. Immunol.*, 1990; 144: 4121-4128
- [39] Gorbachev A.V., Dilulio N.A., Fairchild R.L.: IL-12 augments CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses and circumvents anti-CD154 antibody-mediated inhibition. *J. Immunol.*, 2001; 167: 156-162
- [40] Gorbachev A.V., Fairchild R.L.: CD4+ T cells regulate CD8+ T cell-mediated cutaneous immune responses by restricting effector T cell development through a Fas ligand-dependent mechanism. *J. Immunol.*, 2004; 172: 2286-2295
- [41] Gorbachev A.V., Fairchild R.L.: CD4+CD25+ regulatory T cells utilize FasL as mechanism to restrict DC priming functions in cutaneous immune responses. *Eur. J. Immunol.*, 2010; 40: 2006-2015
- [42] Gorbachev A.V., Fairchild R.L.: Regulatory role of CD4+ T cells during the development of contact hypersensitivity responses. *Immunol. Res.*, 2001; 24: 69-77
- [43] Gorbachev A.V., Heeger P.S., Fairchild R.L.: CD4+ and CD8+ T cell priming for contact hypersensitivity occurs independently of CD40-CD154 interactions. *J. Immunol.*, 2001; 166: 2323-2332
- [44] Grabbe S., Schwarz T.: Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today*, 1998; 19: 37-44
- [45] Griffiths C.E., Dearman R.J., Cumberbatch M., Kimber I.: Cytokines and Langerhans cell mobilization in mouse and man. *Cytokine*, 2005; 32: 67-70
- [46] Hauser C.: Cultured epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact sensitivity. *J. Invest. Dermatol.*, 1990; 95: 436-440
- [47] He D., Wu L., Kim H.K., Li H., Elmetts C.A., Xu H.: IL-17 and IFN-γ mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. *J. Immunol.*, 2009; 183: 1463-1470
- [48] Herrick C.A., MacLeod H., Glusac E., Tigelaar R.E., Bottomly K.: Th2 responses induced by epicutaneous or inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 765-775
- [49] Hertl M., Bohlen H., Jugert F., Boecker C., Knaup R., Merk H.F.: Predominance of epidermal CD8+ T lymphocytes in bullous cutaneous reactions caused by β-lactam antibiotics. *J. Invest. Dermatol.*, 1993; 101: 794-799
- [50] Herzog W.R., Millet I., Ferreri N.R., Ramabhadran R., Schreurs J., Askenase P.W.: An antigen-specific DTH-initiating cell clone: functional, phenotypical and partial molecular characterization. *J. Immunol.*, 1990; 144: 3667-3676
- [51] Ishii N., Takahashi K., Nakajima H., Tanaka S., Askenase P.W.: DNFB contact sensitivity (CS) in BALB/c and H3H/He mice: requirement for early-occurring, early-acting, antigen-specific, CS-initiating cells with an unusual phenotype (Thy-1+, CD5+, CD3-, CD4-, CD8-, sIg-, B220+, MHC class II-, CD23+, IL-2R-, IL-3R+, Mel-14-, Pgp-1+, J11d+, MAC-1+, LFA-1+, and FcγRII+). *J. Invest. Dermatol.*, 1994; 102: 321-327

- [52] Itakura A., Szczepanik M., Campos R.A., Paliwal V., Majewska M., Matsuda H., Takatsu K., Askenase P.W.: An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. *J. Immunol.*, 2005; 175: 7170-7178
- [53] Juryńczyk M., Walczak A., Jurewicz A., Jesionek-Kupnicka D., Szczepanik M., Selmaj K.: Immune regulation of multiple sclerosis by transdermally applied myelin peptides. *Ann. Neurol.*, 2010; 68: 593-601
- [54] Kalish R.S., Askenase P.W.: Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: implications for allergies, asthma, and autoimmunity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999; 103: 192-199
- [55] Kalish R.S., Wood J.A., LaPorte A.: Processing of urushiol (poison ivy) hapten by both endogenous and exogenous pathways for presentation to T cells in vitro. *J. Clin. Invest.*, 1994; 93: 2039-2047
- [56] Kaplan D.H., Igyártó B.Z., Gaspari A.A.: Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012; 12: 114-124
- [57] Kehren J., Desvignes C., Krasteva M., Ducluzeau M.T., Assossou O., Horand F., Hahne M., Kagi D., Kaiserlian D., Nicolas J.F.: Cytotoxicity is mandatory for CD8+ T cell-mediated contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, 1999; 189: 779-786
- [58] Kimber I., Basketter D.A., Gerberick G.F., Dearman R.J.: Allergic contact dermatitis. *Int. Immunopharmacol.*, 2002; 2: 201-211
- [59] Kimber I., Dearman R.J.: Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis*, 2002; 46: 1-5
- [60] Kish D.D., Gorbachev A.V., Fairchild R.L.: CD8+ T cells produce IL-2, which is required for CD4+CD25+ T cell regulation of effector CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J. Leukoc. Biol.*, 2005; 78: 725-735
- [61] Kish D.D., Gorbachev A.V., Fairchild R.L.: Regulatory function of CD4+CD25+ T cells from class II MHC-deficient mice in contact hypersensitivity responses. *J. Leukoc. Biol.*, 2007; 82: 85-92
- [62] Kobayashi Y., Matsumoto M., Kotani M., Makino T.: Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langerhans cell migration and maturation. *J. Immunol.*, 1999; 163: 5989-5993
- [63] Kolesaric A., Stingl G., Elbe-Bürger A.: MHC class I+II – dendritic cells induce hapten-specific immune responses in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, 1997; 109: 580-585
- [64] Krasteva M., Kehren J., Ducluzeau M.T., Sayag M., Cacciapuoti M., Akiba H., Descotes J., Nicolas J.F.: Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity. *Eur. J. Dermatol.*, 1999; 9: 65-77
- [65] Krasteva M., Kehren J., Ducluzeau M.T., Sayag M., Dupuis M., Kanitakis J., Nicolas J.F.: Contact dermatitis II. Clinical aspects and diagnosis. *Eur. J. Dermatol.*, 1999; 9: 144-160
- [66] Krasteva M., Kehren J., Horand F., Akiba H., Choquet G., Ducluzeau M.T., Tédone R., Garrigue J.L., Kaiserlian D., Nicolas J.F.: Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J. Immunol.*, 1998; 160: 1181-1190
- [67] Krause I., Blank M., Shoenfeld Y.: Immunomodulation of experimental autoimmune diseases via oral tolerance. *Crit. Rev. Immunol.*, 2000; 20: 1-16
- [68] Kripke M.L., Munn C.G., Jeevan A., Tang J.M., Bucana C.: Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J. Immunol.*, 1990; 145: 2833-2838
- [69] Lappin M.B., Kimber I., Norval M.: The role of dendritic cells in cutaneous immunity. *Arch. Dermatol. Res.*, 1996; 288: 109-121
- [70] Lepoittevin J.P., Leblond I.: Hapten-peptide-T cell receptor interactions: molecular basis for the recognition of haptens by T lymphocytes. *Eur. J. Dermatol.*, 1997; 7: 151-154
- [71] Lobo F., Zajac K., Majewska M., Zemelka M., Szczepanik M.: Epicutaneous immunization with protein antigen protects from collagen induced arthritis. *J. Immunol.*, 2006; 176: 115-13
- [72] Majewska M., Zajac K., Kubera M., Bryniarski K., Ptak M., Basta-Kaim A., Książek L., Ptak W., Lasoń W., Szczepanik M.: Effect of ovalbumin on the survival of an H-Y incompatible skin graft in C57BL/6 mice. *Pharmacol. Rep.*, 2006; 58: 439-442
- [73] Majewska M., Zajac K., Srebro Z., Sura P., Książek L., Zemelka M., Szczepanik M.: Epicutaneous immunization with myelin basic protein protects from the experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pharmacol. Rep.*, 2007; 59: 74-79
- [74] Majewska M., Zajac K., Srebro Z., Sura P., Książek L., Zemelka M., Szczepanik M.: Epicutaneous (EC) immunization with myelin basic protein (MBP) protects from the experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.*, 2008; 33 (Suppl.1): 2.98
- [75] Majewska-Szczepanik M., Zemelka-Wiącek M., Ptak W., Wen L., Szczepanik M.: Epicutaneous immunization with DNP-BSA induces CD4(+) CD25(+) Treg cells that inhibit Tc1-mediated CS. *Immunol. Cell. Biol.*, 2012, 90: 784-795
- [76] Martin S., Lappin M.B., Kohler J., Delattre V., Leicht C., Preckel T., Simon J.C., Weltzien H.U.: Peptide immunization indicates that CD8+ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.*, 2000; 115: 260-266
- [77] Martin S.F.: T lymphocyte-mediated immune responses to chemical haptens and metal ions: implications for allergic and autoimmune disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004; 134: 186-198
- [78] Martin S.F., Dudda J.C., Bachtanian E., Lembo A., Liller S., Dürr C., Heimesaat M.M., Bereswill S., Fejer G., Vassileva R., Jakob T., Freudenberg N., Termeer C.C., Johnner C., Galanos C., Freudenberg M.A.: Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, 2008; 205: 2151-2162
- [79] McHale J.F., Harari O.A., Marshall D., Haskard D.O.: Vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 at the onset of eliciting contact hypersensitivity in mice: evidence for a dominant role of TNF- α . *J. Immunol.*, 1999; 162: 1648-1655
- [80] Min S.Y., Park K.S., Cho M.L., Kang J.W., Cho Y.G., Hwang S.Y., Park M.J., Yoon C.H., Min J.K., Lee S.H., Park S.H., Kim H.Y.: Antigen-induced, tolerogenic CD11c+, Cd11b+ dendritic cells are abundant in Peyer's patches during the induction of oral tolerance to type II collagen and suppress experimental collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 887-898
- [81] Mosmann T.R., Coffman R.L.: TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, 1989; 7: 145-173
- [82] Moulon C., Wild D., Dormoy A., Weltzien H.U.: MHC-dependent and -independent activation of human nickel-specific CD8+ cytotoxic T cells from allergic donors. *J. Invest. Dermatol.*, 1998; 111: 360-366
- [83] Nakamura K., Aizawa M.: Studies on the genetic control of picryl chloride contact hypersensitivity reaction in inbred rats. *Transplant. Proc.*, 1981; 13: 1400-1403
- [84] O'Leary J.G., Goodarzi M., Drayton D.L., von Andrian U.H.: T-cell and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat. Immunol.*, 2006; 7: 507-516
- [85] Ptak W., Askenase P.W.: $\gamma\delta$ cells assist $\alpha\beta$ T cells in adoptive transfer of contact sensitivity. *J. Immunol.*, 1992; 149: 3503-3508
- [86] Ptak W., Szczepanik M., Bryniarski K., Tutaj M., Ptak M.: Epicutaneous application of protein antigens incorporated into cosmetic cream induces antigen-nonspecific unresponsiveness in mice and affects the cell-mediated immune responses. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2002; 128: 8-14
- [87] Riemann H., Schwarz A., Grabbe S., Aragane Y., Luger T.A., Wysocka M., Kubin M., Trinchieri G., Schwarz T.: Neutralization of IL-12

in vivo prevents induction of contact hypersensitivity and induces hapten-specific tolerance. *J. Immunol.*, 1996; 156: 1799-1803

[88] Ring S., Karakhanova S., Johnson T., Enk A.H., Mahnke K.: Gap junction between regulatory T cells and dendritic cells prevent sensitization of CD8⁺ T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010; 125: 237-246

[89] Ring S., Oliver S.J., Cronstein B.N., Enk A.H., Mahnke K.: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reaction through a CD39, adenosine-dependent mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009; 123: 1287-1296

[90] Ring S., Schäfer S.C., Mahnke K., Lehr H.A., Enk A.H.: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur. J. Immunol.*, 2006; 36: 2981-2992

[91] Robert C., Kupper T.S.: Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N. Engl. J. Med.*, 1999; 341: 1817-1828

[92] Rock K.L.: A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol. Today*, 1996; 17: 131-137

[93] Saint-Mezard P., Berard F., Dubois B., Kaiserlian D., Nicolas J.F.: The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur. J. Dermatol.*, 2004; 14: 131-138

[94] Saint-Mezard P., Chavagnac C., Vocanson M., Kehren J., Rozières A., Bosset S., Ionescu M., Dubois B., Kaiserlian D., Nicolas J.F., Berard F.: Deficient contact hypersensitivity reaction in CD4⁺ - mice is because of impaired hapten-specific CD8⁺ T cell functions. *J. Invest. Dermatol.*, 2005; 124: 562-569

[95] Saint-Mezard P., Krasteva M., Chavagnac C., Bosset S., Akiba H., Kehren J., Kanitakis J., Kaiserlian D., Nicolas J.F., Berard F.: Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J. Invest. Dermatol.*, 2003; 120: 641-647

[96] Saint-Mezard P., Rosieres A., Krasteva M., Berard F., Dubois B., Kaiserlian D., Nicolas J.F.: Allergic contact dermatitis. *Eur. J. Dermatol.*, 2004; 14: 284-295

[97] Sallusto F., Lenig D., Förster R., Lipp M., Lanzavecchia A.: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector function. *Nature*, 1999; 401: 708-712

[98] Saloga J., Knop J., Kolde G.: Ultrastructural cytochemical visualization of chromium in the skin of sensitized guinea pigs. *Arch. Dermatol. Res.*, 1988; 280: 214-219

[99] Sinigaglia F.: The molecular basis of metal recognition by T cells. *J. Invest. Dermatol.*, 1994; 102: 398-401

[100] Staines N.A., Derry C.J., Marinova-Mutafchieva L., Ali N., Davies D.H., Murphy J.J.: Constraints on the efficacy of mucosal tolerance in treatment of human and animal arthritis diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004; 1029: 250-259

[101] Stern R., Kogan G., Jedrzejewski M.J., Soltes L.: The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol. Adv.*, 2007; 25: 537-557

[102] Stoitzner P., Pfaller K., Stössel H., Romani N.: A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J. Invest. Dermatol.*, 2002; 118: 117-125

[103] Szczepanik M.: Regulation of contact hypersensitivity responses by different populations of T suppressor cells. Skin induced tolerance and its clinical implications. *Recent Res. Devel. Immunol.*, 2002; 4: 641-667

[104] Szczepanik M.: Skin induces tolerance and its clinical implications. *Mod. Asp. Immunobiol.*, 2002; 2: 265-268

[105] Szczepanik M.: Skin-induced tolerance and its reversal by Toll-like receptor ligands. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2007; 55: 161-172

[106] Szczepanik M., Bryniarski K., Tutaj M., Ptak M., Skrzeczyńska J., Askenase P.W., Ptak W.: Epicutaneous immunization induces $\alpha\beta$ T-cell receptor CD4 CD8 double-positive non-specific suppressor T cells

that inhibit contact sensitivity via transforming growth factor-beta. *Immunology*, 2005; 115: 42-54

[107] Szczepanik M., Tutaj M., Bryniarski K., Dittel B.N.: Epicutaneously induced TGF- β -dependent tolerance inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, 2005; 164: 105-114

[108] Takeyoshi M., Lida K., Suzuki K., Yamazaki S.: Skin sensitization potency of isoeugenol and its dimers evaluated by a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay and guinea pig maximization test. *J. Appl. Toxicol.*, 2008; 28: 530-534

[109] Toussiot E.A.: Oral tolerance in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 2002; 1: 45-52

[110] Trautmann A., Akdis M., Kleemann D., Altznauer F., Simon H.U., Graeve T., Noll M., Bröcker E.B., Blaser K., Akdis C.A.: T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J. Clin. Invest.*, 2000; 106: 25-35

[111] Trial J.: Adoptive transfer of early and late delayed-type hypersensitivity reactions mediated by human T cells. *Reg. Immunol.*, 1989; 2: 14-21

[112] Trial J.: Cooperation between early acting delayed-type hypersensitivity T-cells and cultured effector cells in tumor rejection. *Cancer Res.*, 1988; 48: 5922-5926

[113] Tsuji R.F., Geba G.P., Wang Y., Kawamoto K., Matis L.A., Askenase P.W.: Required early complement activation in contact sensitivity with generation of local C5-dependent chemotactic activity and late T cell interferon γ : a possible initiating role of B cell. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1015-1026

[114] Tsuji R.F., Kawikova I., Ramabhadran R., Akahira-Azuma M., Taub D., Hugli T.E., Gerard C., Askenase P.W.: Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment. *J. Immunol.*, 2000; 165: 1588-1598

[115] Tsuji R.F., Kikuchi M., Askenase P.W.: Possible involvement of C5/C5a in the efferent and elicitation phases of contact sensitivity. *J. Immunol.*, 1996; 156: 4444-4450

[116] Tsuji R.F., Szczepanik M., Kawikova I., Paliwal V., Campos R.A., Itakura A., Akahira-Azuma M., Baumgarth N., Herzenberg L.A., Askenase P.W.: B cell-dependent T cell responses: IgM antibodies are required to elicit contact sensitivity. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 1277-1290

[117] Tutaj M., Szczepanik M.: Epicutaneous (EC) immunization with myelin basic protein (MBP) induces TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺ CD8⁺ double positive suppressor cells that protect from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Autoimmunol.*, 2007; 28: 208-215

[118] Van Beelen A.J., Teunissen M.B., Kapsenberg M.L., Jong E.C.: Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2007; 7: 374-381

[119] Van Hoogstraten I.M., Boden D., von Blomberg M.E., Kraal G., Scheper R.J.: Persistent immune tolerance to nickel and chromium by oral administration prior to cutaneous sensitization. *J. Invest. Dermatol.*, 1992; 99: 608-616

[120] Van Hoogstraten I.M., Boos C., Boden D., von Blomberg M.E., Scheper R.J.: Oral induction of tolerance to nickel sensitization in mice. *J. Invest. Dermatol.*, 1993; 101: 26-31

[121] Van Loveren H., Askenase P.W.: Delayed-type hypersensitivity is mediated by a sequence of two different T cell activities. *J. Immunol.*, 1984; 133: 2397-2401

[122] Vocanson M., Rozières A., Hennino A., Poyet G., Gaillard V., Renaudineau S., Achachi A., Benetiere J., Kaiserlian D., Dubois B., Nicolas J.F.: Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of Th17/Th1 and regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010; 126: 280-288

[123] Wagner L., Yang O.O., Garcia-Zepeda E.A., Ge Y., Kalams S.A., Walker B.D., Pasternack M.S., Luster A.D.: Beta-chemokines are re-

leased from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*, 1998; 391: 908-911

[124] Wang B., Esche C., Mamelak A., Freed I., Watanabe H., Sauder D.N.: Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2003; 14: 381-389

[125] Wang B., Fujisawa H., Zhuang L., Freed I., Howell B.G., Shahid S., Shivji G.M., Mak T.W., Sauder D.N.: CD4⁺ Th1 and CD8⁺ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J. Immunol.*, 2000; 165: 6783-6790

[126] Wang B., Fujisawa H., Zhuang L., Kondo S., Shivji G.M., Kim C.S., Mak T.W., Sauder D.N.: Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75. *J. Immunol.*, 1997; 159: 6148-6155

[127] Wang L.F., Wu J.T., Sun C.C.: Local but not systemic administration of IFN- γ during the sensitization phase of protein antigen immunization suppress Th2 development in a murine model of atopic dermatitis. *Cytokine*, 2002; 19: 147-152

[128] Watanabe H., Unger M., Tuvel B., Wang B., Sauder D.N.: Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2002; 22: 407-412

[129] Weber F.C., Esser P.R., Müller T., Ganesan J., Pellegatti P., Simon M.M., Zeiser R., Idzko M., Jakob T., Martin S.F.: Lack of the purinergic receptor P2X7 results in resistance to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, 2010; 207: 2609-2619

[130] Weiner H.L.: Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J. Clin. Invest.*, 2000; 106: 935-937

[131] Weiner H.L.: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- β -secreting regulatory cells. *Microbes Infect.*, 2001; 3: 947-954

[132] Weiner H.L., Friedman A., Miller A., Khoury S.J., Al-Sabbagh A., Santos L., Sayegh M., Nussenblatt R.B., Trentham D.E., Hafler D.A.:

Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994; 12: 809-837

[133] Weltzien H.U., Moulon C., Martin S., Padovan E., Hartmann U., Kohler J.: T cell immune response to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology*, 1996; 107: 141-151

[134] Xiao B.G., Link H.: Mucosal tolerance: a two-edged sword to prevent and treat autoimmune diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1997; 85: 119-128

[135] Xu H., Banerjee A., Dilulio N.A., Fairchild R.L.: Development of effector CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity occurs independently of CD4⁺ T cells. *J. Immunol.*, 1997; 158: 4721-4728

[136] Xu H., Dilulio N.A., Fairchild R.L.: T cell populations primed by hapten sensitization on contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon- γ -producing (Tc1) effector CD8⁺ T cells and interleukin (IL) 4/IL-10-producing (Th2) negative regulatory CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 1996; 183: 1001-1012

[137] Zając K., Stochmal E., Szczepanik M.: Epicutaneous immunization with collagen protects from the development of collagen induced arthritis (CIA). *Eur. J. Immunol.*, 2008; 33 (Suppl. 1): 2.82

[138] Zemelka M., Szczepanik M.: Epicutaneous (ec) immunization with DNP-coupled protein antigen suppresses Tc1 CD8⁺ mediated contact sensitivity in mice. *Eur. J. Immunol.*, 2008; 33 (Suppl. 1): 6.96

[139] Zemelka-Wiącek M., Majewska-Szczepanik M., Ptak W., Szczepanik M.: Epicutaneous immunization with protein antigen induces antigen-non-specific suppression of CD8 T cell mediated contact sensitivity. *Pharmacol. Rep.*, 2012; 64: 1497-1504

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.